



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
***CAMPUS* REALEZA**
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ANDRÉ MARCOS DEZAN BIENIEK

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO SÊMEN BOVINO APÓS
DESCONGELAÇÃO COM ACRÉSCIMO DE EXTRATO NATURAL**

REALEZA
2024

ANDRÉ MARCOS DEZAN BIENIEK

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO SÊMEN BOVINO APÓS
DESCONGELAÇÃO COM ACRÉSCIMO DE EXTRATO NATURAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Medicina Veterinária da Universidade
Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito
para obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adalgiza Pinto Neto
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Fartura

REALEZA

2024

ANDRÉ MARCOS DEZAN BIENIEK

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO SÊMEN BOVINO APÓS
DESCONGELAÇÃO COM ACRÉSCIMO DE EXTRATO NATURAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Médico Veterinário.

Este trabalho de conclusão foi defendido e aprovado pela banca em 06/12/2024.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

ADALGIZA PINTO NETO

Data: 13/12/2024 15:24:55-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Adalgiza Pinto Neto - UFFS
Orientadora



Documento assinado digitalmente

DALILA MOTER BENEVENU

Data: 13/12/2024 15:13:44-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Dalila Moter Benvegnú - UFFS
Avaliadora



Documento assinado digitalmente

CAMILA KETERINE GORZELANSKI TRENKEL

Data: 13/12/2024 15:13:34-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a MSc. Camila Keterine Gorzelanski Trenkel - UFFS
Avaliadora

Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim, desde a mais pífia esperança, até aqueles que me acolheram nos momentos mais turgidos, em especial a minha família.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é o resultado de muito esforço, aprendizado e apoio de várias pessoas. Em primeiro lugar, agradeço:

Aos meus pais, meu pai Marcos Gilberto Bieniek e minha mãe Sandra Denis Dezan Bieniek, cuja dedicação, paciência e incentivo foram fundamentais em cada etapa;

Às minhas avós, Delise Dezan e Terezinha Kischel, pela sabedoria e carinho que sempre me guiaram, e aos meus saudosos avôs Olisses Dezan e Henrique Bieniek, cuja memória é uma fonte constante de inspiração e força;

Ao meu irmão, Alessandro Dezan Bieniek, pelo apoio;

Aos todos os meus amigos, por toda a cumplicidade e leveza que tornaram essa jornada mais rica e especial;

A minha orientadora, Prof.^a Adalgiza Pinto Neto, que, com seu conhecimento e paciência, guiou este trabalho com dedicação;

À todos os professores, por cada ensinamento, pela inspiração e por ajudarem a construir o conhecimento que tornou este projeto possível;

À Camila Trenkel por toda ajuda durante a realização deste trabalho;

Ao Grupo PET – Medicina Veterinária / Agricultura Familiar por ser um grupo tão unido que me ajudou em muitos aspectos durante minha trajetória, e também ao Laboratório de Reprodução Animal – LABRA, da Universidade Federal da Fronteira Sul, sem as excelentes pessoas que conheci, não seria possível a realização deste trabalho;

Não posso esquecer de mencionar minhas gatas, Luna e em memória de Morgana, cuja companhia trouxe alegria e conforto nas horas de estudo, e

A todos que, de alguma forma, contribuíram com palavras de apoio, conselhos e gestos de generosidade, meu mais sincero agradecimento.

Muito obrigado!

“A Medicina cura o homem, a Medicina Veterinária cura a humanidade”
(Pasteur, sem data, não paginado)

RESUMO

O uso de biotecnologias garante melhorias nos processos reprodutivos, possibilitando maiores taxas de gestação, como o uso de práticas como inseminação artificial (IA) e a fertilização *in vitro* (FIV). Embora o uso de sêmen fresco possibilite maiores taxas de gestação, quando criopreservado, possibilita manejo facilitado com estocagem por maiores períodos. Para a criopreservação do sêmen, exige-se o uso de crioprotetores e outros diluentes como o glicerol. A presença de bactérias no sêmen, oriundas de uma fonte de contaminação, por sua vez podem reduzir a capacidade de fecundação dos espermatozoides, devido isso o uso de antimicrobianos capazes de mitigar a proliferação e viabilidade das bactérias são cada vez mais pesquisados. Na FIV a presença de bactérias está associada ao baixo sucesso da técnica e na IA há quadros de endometrites. Os extratos naturais, cada vez mais vistos como potencialidades, especialmente nos mercados que buscam sustentabilidade. Assim, pesquisas que buscam novos compostos naturais com capacidades antioxidantes e antimicrobianas são muito desejadas. Neste sentido, o extrato de NP apresenta essas características, desta forma, seu acréscimo ao sêmen como diluente surge, podendo apresentar futuros avanços nas biotecnologias da reprodução. Diante disso, foram testadas 4 coletas, separadas e 4 amostras de sêmen bovino acrescido com três concentrações de NP (0,5%, 0,75% e 1%), comparadas com uma amostra controle, visando a quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC). Observou-se que houve ausência de crescimento de bactérias Gram-negativas, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp* e *Shigella spp*. Nas que tiveram crescimento, no caso das bactérias mesófilas e *Staphylococcus spp* nenhuma das amostras acrescidas com NP nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1%, apresentaram redução no número de unidades formadoras de colônia (UFC) significativos. Conclui-se que neste estudo o NP não foi capaz de reduzir significativamente o número de UFC nas amostras. Para pesquisas futuras se espera fazer estudos voltados para contaminação experimental e avaliação da viabilidade do NP meio rico em matéria orgânica.

Palavras-chave: sêmen bovino; FIV; inseminação artificial; antimicrobiano; criopreservação.

ABSTRACT

The use of biotechnology ensures improvements in reproductive processes, enabling higher pregnancy rates, such as the use of practices such as artificial insemination (AI) and in vitro fertilization (IVF). Although the use of fresh semen enables higher pregnancy rates, when cryopreserved, it allows for easier handling with storage for longer periods. Cryopreservation of semen requires the use of cryoprotectants and other diluents such as glycerol. The presence of bacteria in semen, originating from a source of contamination, in turn can reduce the fertilization capacity of sperm, therefore the use of antimicrobials capable of mitigating the proliferation and viability of bacteria is increasingly being researched. In IVF, the presence of bacteria is associated with the low success of the technique and in AI there are cases of endometritis. Natural extracts are increasingly seen as potential, especially in markets seeking sustainability. Therefore, research seeking new natural compounds with antioxidant and antimicrobial capabilities is highly desired. In this sense, NP extract presents these characteristics, thus, its addition to semen as a diluent arises, which may present future advances in reproductive biotechnology. In view of this, 4 separate collections and 4 samples of bovine semen added with three concentrations of NP (0.5%, 0.75% and 1%) were tested, compared with a control sample, aiming at the quantification of colony forming units (CFU). It was observed that there was no growth of Gram-negative bacteria, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp. In those that did show growth, in the case of mesophilic bacteria and *Staphylococcus* spp, none of the samples added with NP at concentrations of 0.5%, 0.75% and 1%, showed a significant reduction in the number of colony forming units (CFU). It is concluded that in this study, NP was not able to significantly reduce the number of CFU in the samples. Future research is expected to involve studies focused on experimental contamination and evaluation of the viability of NP in a medium rich in organic matter.

Keywords: bovine sêmen; FIV; artificial insemination; antimicrobial; cryopreservation.

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO	8
2METODOLOGIA	12
2.1COLETA DAS AMOSTRAS	12
2.1.1Local e animal.....	12
2.1.2Procedimento de coleta	12
2.2PREPARAÇÃO DO EXTRATO NATURAL	13
2.3CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN	14
2.4CONTROLE MICROBIOLÓGICO	14
2.4.1Contagem e identificação de <i>P. aeruginosa</i>.....	14
2.4.2Contagem e identificação de Gram negativas	15
2.4.3Contagem e identificação de mesófilos	15
2.4.4Contagem e identificação de <i>Staphylococcus spp.</i>	16
2.4.5Contagem e identificação de <i>Salmonella spp</i> e <i>Shigella spp</i>.....	16
2.5ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
3RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
3.1CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC).....	18
4CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
5REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto maior país em extensão territorial no mundo, tendo um forte setor pecuário com grande participação na economia e no produto interno bruto (PIB), com grandes perspectivas de crescimento do segmento. Somente no ano de 2023, a bovinocultura de corte teve o segundo maior valor bruto de produção (VPB) chegando a R\$ 183,31 bilhões conferindo a ela segundo lugar no *ranking* de maior VPB do país, representando grande potencial produtivo (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil - CNA, 2023),

O Brasil tem o segundo maior rebanho bovino comercial do mundo, com 234.35 milhões de cabeças, alocados principalmente nos estados de Mato Grosso, Pará e São Paulo, com crescimento em ritmo significativo nos últimos anos (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2022).

As biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial (IA) e a fertilização *in vitro* (FIV) são cada vez mais adotadas por produtores que buscam maior eficiência produtiva e reprodutiva nos plantéis bovinos (Bozzi, *et al.*, 2023).

A IA é uma técnica que está sendo utilizada de forma crescente, permitindo a multiplicação de material genético de um macho específico de forma rápida em ampla escala, onde de um ejaculado podem ser envasadas muitas doses de sêmen com volume reduzido, mas com número de espermatozoides suficiente para fecundar o oócito feminino (Celeghini *et al.*, 2017; Baruselli *et al.*, 2004).

A IA apresenta grande importância na entrada de patógenos em rebanhos que nunca tiveram contato com doenças como brucelose, leptospirose, micoplasmose, clamidífilose, histofilose, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD) e língua azul, uma vez que os agentes etiológicos destas doenças podem estar presentes no sêmen e sobreviver ao processo de criopreservação (Lemaire *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 2012).

O sêmen criopreservado contaminado pode afetar negativamente a fertilidade, devido a presença de crioprotetores e diluentes, que permite maior viabilidade não somente das células espermáticas, mas também a sobrevivência de possíveis agentes patógenos, como bactérias (Freitas *et al.*, 2020).

De mesma maneira com a criopreservação do sêmen bovino permitiu-se a comercialização de genéticas superiores com maior facilidade, e consequente

melhoria nos rebanhos, as técnicas de IA, inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e produção e transferência de embriões *in vitro* também foram pontos chaves (Leite *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2022).

O sêmen é uma suspensão aquosa que contém espermatozoides produzidos nos testículos e armazenados no epidídimo, e secreções das glândulas acessórias do trato genital masculino, que permitem a sobrevivência das células como meio nutritivo, de deslocamento e de proteção durante o trânsito no trato reprodutivo da fêmea e fecundação (Mies Filho, 1987; Rodrigues, 2009; Colville; Bassert, 2010).

Com o uso da IA, possibilitou-se que os touros não necessariamente precisassem se fazer presentes nas propriedades, fazendo-se a coleta e posteriormente inseminação, permitindo a produção de bezerros mais uniformes, mais produtivos e rentáveis, pela diminuição no intervalo de parto e ganho genético pelo uso de bovinos provenientes de outras localidades (Rodgers *et al.*, 2012; Baruselli *et al.*, 2017).

Para a conservação do sêmen criopreservado são usados crioprotetores e diluentes como glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO), que são usados para manutenção da osmolaridade e tamponamento do meio fluido onde os espermatozoides se encontram, permitindo sua viabilidade por maiores períodos (Madeira *et al.*, 2014; Bertol *et al.*, 2014).

São usadas também lipoproteínas de baixa densidade (LDL), a fim de proteger os espermatozoides de choques térmicos, sendo uma alternativa a gema de ovo (González *et al.*, 2023; Moussa *et al.*, 2002; Madeira *et al.*, 2013). Além disso, muitos outros aditivos podem ser acrescentados aos diluentes, como enzimas, agentes antioxidantes e antibióticos (Leite *et al.*, 2011; Bertol *et al.*, 2014).

O uso de antibióticos se dá para minimizar a contaminação natural do sêmen, de maneira a diminuir a transmissão de doenças e reduzir os riscos de endometrites pela IA sendo uma técnica auxiliar as boas práticas de higiene do processo de coleta do sêmen (Prado e Pérez, 2005).

Genovez *et al.* (2011) apontaram que pela técnica da IA, no processo de deposição do sêmen diretamente no útero do animal, há possibilidade de facilitação da ocorrência de endometrites, uma vez que os microrganismos não são expostos ao pH ácido vaginal e a ação bactericida da secreção cérvico-vaginal produzida durante o estro.

A presença de contaminantes também pode influenciar negativamente aspectos reprodutivos associados com menores taxas de gestação e concepção (Genovez *et al.*, 1999). Souza *et al.* (2019) relataram que há poucos relatos da microbiota natural no sêmen de bovinos reprodutores, não definindo quais são os microrganismos próprios do ejaculado dos ruminantes.

Reda *et al.* (2020) abordaram que a prevalência de bactérias no esperma tem efeitos prejudiciais nas células espermáticas, com redução da motilidade, viabilidade e morfologia dos espermatozoides, podendo também ocasionar a liberação das enzimas que permitem a reação acrossomal de forma prematura, impossibilitando a adequada fertilização do oócito pelo espermatozoide.

é um processo que ocorre no espermatozoide durante a fertilização e que consiste na liberação de enzimas que permitem a penetração do espermatozoide no óvulo

Đuracká *et al.* (2021) encontraram correlação positiva entre a carga bacteriana e leucócitos no sêmen, além da quantidade de bactérias que podem afetar na resposta imune, causando estresse oxidativo e contribuindo para alterações morfológicas e quedas na capacidade de fertilização.

A noz-pecã (*Carya illinoensis*) possui em sua casca, folhas e sementes compostos bioativos com potencial antimicrobiano e antioxidante (Prado *et al.*, 2009), que incluem, mas não se limitam ao ácido elágico, ácido gálico, catequina, epicatequina, e outros compostos fenólicos e taninos.

Moura *et al.* (2018), avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico da casca de noz-pecã e demonstraram que na concentração de 2,5% foi capaz de inibir o crescimento de *S. flexneri*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Os resultados indicaram que os extratos de noz-pecã apresentaram potencial bacteriostático significativo contra esses microrganismos.

Moura *et al.* (2019) usaram o extrato aquoso de casca de noz-pecã e relataram ação bactericida contra cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. cereus* e *P. aeruginosa*. Nas concentrações de 15% (v/v) e 20% (v/v) o extrato apresentou ação contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*.

A instrução normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) N° 47, de 23 de novembro de 2007, determina como requisito sanitário para a produção e comercialização de sêmen bovino congelado, a adição de antibióticos ao material. Devido há diversos fatores associados atualmente relata-se a diminuição

da eficácia dos antimicrobianos, sendo como alternativa a uso de antibióticos convencionais o uso de compostos naturais (Madeira *et al.*, 2014).

Alguns microrganismos mesófilos que crescem em temperaturas entre 20 e 40°C como as gram positivas como *Micrococcus spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, e gram negativas como *Escherichia coli*, *P. aeruginosa.*, *Alcaligenes Faecalis*, *Pseudomonas Pyocyanea*, *Proteus Vulgaris*, *Acinetobacter spp.*, além de fungos e leveduras são ubiqüitários (comensais) da cavidade prepucial e podem estar relacionados com a contaminação e baixos índices reprodutivos (Genovez, Scarcelli e Carvalho. 2011).

A contaminação do sêmen pode ocorrer por via descendente, devido a enfermidades sistêmicas, que se estendem ao aparelho reprodutor, ou poder ser ascendentes partindo do das estruturas reprodutivas e atingindo caráter sistêmico. Dentre as muitas doenças que podem acometer os bovinos algumas podem apresentar caráter zoonótico como *Brucella abortus*, *Leptospira Spp.*, *Campylobacter fetus subsp. fetus*, *Chlamydomphila spp* (Genovez, Scarcelli e Carvalho, 2011). Madeira *et al.* (2014) encontraram redução no número de unidades formadoras de colônia quando a coleta de sêmen em carneiros foi submetida a boas condições de higiene, com a lavagem dos materiais e espaços usados durante a coleta, lavagem prepucial, e manutenção da saúde do animal.

Desta maneira a possível utilização da adição do extrato natural da noz-pecã como forma de prevenir, ou mitigar, a ocorrência de contaminação do sêmen por possíveis microrganismos que possam ser relevantes na reprodução é um ponto a ser discutido, podendo inclusive melhorar as taxas de gestação de rebanhos bovinos ou reduzir taxas de falhas nas técnicas de IA e FIV, devido a seu potencial antimicrobiano e antioxidante associado.

Diante disso, objetiva-se com esse estudo quantificar por meio da contagem de bactérias presentes nas amostras de sêmen bovino acrescidos de diluentes baseado no NP de noz-pecã e saber se o acréscimo do extrato em diferentes concentrações pode mitigar o crescimento das mesmas. A possibilidade de uso do extrato da noz-pecã como forma de reduzir os contaminantes no sêmen bovino se dá pelo seu potencial antimicrobiano comprovado por inúmeros autores.

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

2.1.1 Local e animal

As coletas de sêmen foram realizadas nas dependências do Laboratório de Reprodução Animal - LABRA, da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU) da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*, Paraná, após submissão e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFFS), sob protocolo número 4373020124.

Para tanto, um bovino *Bos taurus taurus*, da raça Braford hígado em idade reprodutiva, com escala de condição corporal (ECC) 4-5, seguindo escala de 1-5, descrita por segundo Meneghetti e Vasconcelos (2008), foi submetido a quatro coletas de sêmen, com intervalo de quinze dias, após avaliação e certificação andrológica (CBRA, 2013).

2.1.2 Procedimento de coleta

Para as coletas de sêmen, o bovino foi contido em tronco de contenção, a fim de garantir a segurança do animal e dos manipuladores. Após restrição do reprodutor, realizou-se a higienização do prepúcio, com tricotomia, lavagem com solução de Cloreto de Sódio (0,9%) e secagem com papel toalha. As coletas de sêmen foram realizadas mediante eletroejaculador (BOIJEKTOR® 2001).

As coletas foram realizadas em tubos do tipo falcon de 15 ml. O sêmen fresco foi previamente avaliado através do sistema computadorizado de análise espermática – CASA (IVOSIIR®, Hamilton Thorne), para avaliação da viabilidade espermática.

Os ejaculados em seguida foram diluído em diluidor TRIS-gema de ovo, preparado com base na formulação: TRIS (Tris hidroximetil-aminometano): 2,42 gramas; ácido cítrico: 1,34 gramas; Glicerol: 06mL; Glicose: 1,0 gramas e gema de ovo: 10mL. Todos os constituintes foram mensurados em balança de precisão, e posteriormente dissolvidos em 100mL de água ultrapura (Milli-Q®). A fim de minimizar a ocorrência de precipitações, foi realizada a filtragem diluente TRIS-gema de ovo e do extrato natural (NP), com filtros estéreis de 0,22 micras (UniFil®), antes da diluição e envase.

O sêmen diluído foi acrescido de um extrato natural com potencial antioxidante e antimicrobiano, de acordo com o grupo experimental, como se segue na Tabela 1, onde para cada coleta havia uma amostra de cada grupo e para cada uma das amostras, foram realizados os testes em triplicada se baseando na mesma paleta do grupo de sêmen diluído.

Tabela 1 - Descrição dos grupos experimentais

Grupo	Descrição
Grupo I	Controle: sêmen diluído com TRIS-gema de ovo sem acréscimo
Grupo II	Sêmen diluído, acrescido de 0,5% de extrato natural – NP
Grupo III	Sêmen diluído, acrescido de 0,75% de extrato natural – NP
Grupo IV	Sêmen diluído, acrescido de 1% de extrato natural – NP

Fonte: Elaborada pelo autor (2024)

2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO NATURAL

As cascas utilizadas para extração do NP foram cedidas pela empresa Divinut, localizada no município de Cachoeira do Sul, no Estado do Rio Grande do Sul.

Para obtenção do extrato aquoso do NP, as cascas foram lavadas em água corrente, e submetidas a secagem em estufa a 36°, por 24 horas. Ao passar esse tempo elas foram trituradas em almofariz de porcelana e pistilo, sendo pesadas 50 gramas das cascas de NP em balança de precisão.

O extrato foi obtido no Laboratório de Química da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus Realeza*, com um extrator tipo Soxhlet e como solvente foi usado 250 ml de água destilada. O ciclo da extração foi de quatro horas, após o início do processo de acordo com a metodologia proposta por Amaral et al. (2019) sendo armazenados em frascos âmbar até o procedimento de diluição do sêmen nas paletas.

2.3 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

O sêmen diluído de cada grupo experimental, foi envasado manualmente em palhetas de 0,25 ml, as quais foram identificadas previamente de acordo com o grupo experimental, considerando-se a dose de 10 milhões de espermatozoides viáveis por palheta. As amostras foram vedadas com álcool polivinílico (PVA) e submetidas ao método de congelação convencional. Após o envase, todas as palhetas foram resfriadas por quatro horas, em caixas isotérmicas (Botuflex®), com o intuito de atingir temperatura de 4°C, com taxa de resfriamento de menos 0,14°C/minuto. Após as quatro horas de resfriamento, as caixas isotérmicas foram abertas, e as palhetas submetidas ao pré-congelamento em vapor de nitrogênio por 12 minutos, no qual as palhetas foram mantidas horizontalmente a uma distância de três a quatro centímetros da lâmina de nitrogênio líquido e, em seguida submersas em nitrogênio líquido a -196°C (Salisbury et al., 1978), e armazenadas em botijão criogênico até a realização dos testes.

2.4 CONTROLE MICROBIOLÓGICO

O sêmen de cada grupo experimental foi submetido à cultura microbiológica em placas de Petri em meios seletivos para Gram negativas, *P. aeruginosa*, mesófilos, *Salmonella spp* e *Staphylococcus spp*, para realizar a identificação de acordo com o meio de crescimento das estirpes bacterianas e a contagem global de unidades formadoras de colônia (UFC).

2.4.1 Contagem e identificação de *P. aeruginosa*

Para contagem de microrganismos *P. aeruginosa*, as amostras foram homogeneizadas (200µL de sêmen em 1800µL de solução peptonada estéril 0,1%). Em sequência foi realizado o plaqueamento direto com 10µL das amostras em Ágar Cetrimide (CM) sendo espalhada na superfície da placa com ajuda de uma alça em forma de “T”, cuja temperatura de incubação em estufa bacteriológica foi de 25 °C e 42 °C por 48 horas. Em seguida foram transferidos 0,5 ml da diluição para o Caldo Verde Malaquita (CVM). Após realizado subcultivo em CVM foram semeados 10µL das amostras em placas de CM. As UFC típicas (com pigmento verde azulado, piocianina) são consideradas *P. aeruginosa* (Quinn *et al.*, 2005). Para cada amostra foi realizado teste em triplicata.

2.4.2 Contagem e identificação de bactérias Gram negativas

As amostras foram homogeneizadas para progressão dos testes (200µL de sêmen em 1800µL de solução peptonada estéril 0,1%). A partir das diluições foi inoculado 10µL das amostras em placas de Petri contendo Ágar MacConkey (MC) sendo espalhadas na superfície do ágar pela técnica de Spread-Plate com ajuda de uma alça em forma de “T”. As em seguida as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a uma temperatura de 37°C por 24 horas. Para cada amostra foi realizado teste em triplicata.

2.4.3 Contagem e identificação de microrganismos aeróbios mesófilos

Para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais foram usadas amostras homogeneizadas (200µL de sêmen em 1800µL de solução peptonada estéril 0,1%). Foram semeados 10µL de cada diluição em placas de Petri contendo Ágar

Padrão para Contagem (PCA), sendo espalhadas na superfície da placa pela técnica de Spread-Plate com ajuda de uma alça em forma de “T”. Sendo então incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 72 horas, realizando posteriormente a contagem do número de colônias. Para cada amostra foi realizado teste em triplicata.

2.4.4 Contagem e identificação de *Staphylococcus spp.*

Para a contagem e identificação de microrganismos *Staphylococcus spp* foram usadas amostras homogeneizadas (200µL de sêmen em 1800µL de solução peptonada estéril 0,1%). Foram semeados 10µL de cada diluição em placas de Petri contendo Ágar Sal Manitol (SM), sendo espalhadas na superfície da placa pela técnica de Spread-Plate com ajuda de uma alça em forma de “T”. Sendo então incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 48 horas, realizando posteriormente a contagem do número de colônias. Para cada amostra foi realizado teste em triplicata.

2.4.5 Contagem e identificação de *Salmonella spp* e *Shigella spp*

Para a contagem e identificação de *Salmonella spp* e *Shigella spp* foram usadas amostras homogeneizadas (200µL de sêmen em 1800µL de solução peptonada estéril 0,1%). Foram semeados 10µL de cada diluição em placas contendo Ágar Salmonella e Shigella (SS), sendo espalhadas na superfície da placa pela técnica de Spread-Plate com ajuda de uma alça em forma de “T”. Sendo então incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 48 horas, realizando posteriormente a contagem do número de colônias. Para cada amostra foi realizado teste em triplicata. Os resultados são observados na Tabela 2. Ao fim do período de incubação de cada uma das placas foi então realizada a contagem das UFC se utilizando de um contador de colônias digital.

Tabela 2 - Descrição dos meios de cultura, da temperatura e do período de incubação

Microrganismos	Meio de cultura	Temperatura de incubação	Período de incubação para a contagem global de UFC
<i>P. aeruginosa</i>	Ágar CM	25 °C	48 horas
Gram negativas	Ágar MC	37 °C	24 horas
Mesófilos	Ágar PCA	30 °C	72 horas
<i>Staphylococcus spp</i>	Ágar SM	37 °C	48 horas
<i>Salmonella e Shigella</i>	Ágar SS	37 °C	48 horas

Fonte: Elaborada pelo autor (2024)

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foi realizada a quantificação das colônias média \pm desvio-padrão (caso os dados seguissem distribuição normal) de UFC/ml dos ejaculados. Os dados laboratoriais foram submetidos ao teste de Turkey comparação das médias dos pares, sendo considerado estatisticamente significativos para amostras que obtiveram $p < 0.05$ (5%). Para a estatística foi utilizado o software SAS (SAS, 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC)

Foi realizada a contagem das colônias com contador de colônias digital após o tempo pré-determinado de cada um dos meios de cultura. As todas as coletas (um (A1), dois (A2), três (A3) e quatro (A4) apresentaram crescimento de bactérias somente em Ágar Sal Manitol (SM) e Ágar Padrão para Contagem (PCA). Já nos outros meios não houve crescimento de nenhuma UFC, indicando inexistência de bactérias Gram negativas que cresceriam em Ágar MC, de *P. aeruginosa*, de *Salmonella spp* e *Shigella spp.*, como observado na tabela 3.

Souza *et al.* (2019) relata que há possibilidade de contaminação do sêmen por fômites, equipamentos mal higienizados ou mal esterilizados, nitrogênio líquido contaminado, diluente contaminado por agentes ambientais, na gema do ovo e pelo próprio manipulador. No caso houve ausência de *Salmonella spp* e *Shigella spp*, importantes bactérias que estão associadas a ovos.

Não houve crescimento de bactérias Gram negativas, sendo estas de importância com vários representantes potencialmente patogênicos como fermentadores, enterobactérias, como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.* e bacilos Gram-negativos não fermentadores, principalmente por *P. aeruginosa*, testada separadamente, *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas spp.* (ANVISA, 2007).

Estudos apontam que o sêmen fresco confere maiores taxas de gestação quando comparado ao sêmen fresco e criopreservado, mas este último apresenta maior facilidade e flexibilidade quanto a possibilidade de uso, mesmo sendo mais suscetíveis a alterações na viabilidade, podendo decorrer por conta de estresse químico, mecânico, térmico e osmótico nos espermatozoides (Barcelos; Savi, 2022).

Experimentos utilizando filtrados de *Staphylococcus spp* e *P. aeruginosa* se mostram nocivos no desenvolvimento de embriões de ratos *in vitro* (Meyer *et al.*, 1980; Wierzbowski *et al.*, 1980). Sendo assim a ausência de bactérias gram-negativas se mostra ideal.

Foram obtidos os seguintes resultados após as análises das amostras. Na contagem de mesófilos foram encontradas média de $53 \pm 37,09$ colônias no grupo controle (CT), 57 ± 25 colônias no grupo NP 0,5%, 35 ± 21 colônias no grupo NP 0,75% e 35 ± 14 colônias no grupo NP 1%, não havendo diferenças estatísticas. Já para *Staphylococcus spp*, foram encontradas média de $1,5 \pm 3,63$ colônias grupo controle (CT), $1,5 \pm 2,92$ colônias no grupo NP 0,5%, $1,5 \pm 3,86$ colônias no grupo NP 0,75% e $0,5 \pm 4,50$ colônias no grupo NP 1%, também não havendo diferenças estatísticas, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Descrição da média e desvio padrão da contagem UFC de ejaculado bovino acrescido com diferentes concentrações de NP de bovino Bradford hígido, de quatro coletas e quatro amostras de cada grupo feitos em triplicata.

Bactéria média	Grupo - CT	Grupo - 0,5%	Grupo - 0,75%	Grupo - 1%
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0
Gram negativas	0	0	0	0
Mesófilos	$53 \pm 37,0931$	$57 \pm 25,3775$	$35 \pm 21,1493$	$35 \pm 14,8658$
<i>Staphylococcus spp</i>	$1,5 \pm 3,6390$	$1,5 \pm 2,9271$	$1,5 \pm 3,8612$	$0,5 \pm 4,5092$
<i>Salmonella spp</i> e <i>Shigella spp</i>	0	0	0	0

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

A presença de *Staphylococcus spp* em sêmen industrializado de touros pode se associar à manipulação pelo homem (Genovez *et al.*, 1999). Mas também sendo associada a microbiota própria do prepúcio de touros em baixas quantidades.

A contagem de mesófilos funciona como indicador de qualidade e higiene. Quando elevada indica falhas durante o processo de produção e processamento dos produtos de origem animal (Cardoso *et al.*, 2005), podendo associar que quanto maior a contaminação, maior a probabilidade de outras bactérias patogênicas estarem presentes.

Os dados descritos na Tabela 2 demonstram, para as colônias crescidas em SM, uma grande discrepância no número de bactérias de cada amostra, apresentando desvio padrão bastante elevado. Se encontrou valores semelhantes na Tabela 4, onde a quantidade de mesófilos foi semelhante em todos os grupos, mas variando bastante entre amostras, demonstrando possíveis alterações na quantidade de microrganismos contaminantes em cada uma das partidas.

Tabela 4 - Descrição da média e desvio padrão da contagem UFC das placas de Petri de SM para contagem e quantificação de *Staphylococcus spp.*

Bactéria média	Grupo - CT	Grupo - 0,5%	Grupo - 0,75%	Grupo - 1%
Coleta 1	8±1,15	5±3	8±2,64	7±5,56
Coleta 2	1±1	1±0	1±1	1±0
Coleta 3	4±2,30	4±3,46	4±1,15	1±4,35
Coleta 4	0,3±0,57	1±1	1±0,57	0,3±0,57

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Esse resultado pode ser causado devido a contaminação ou até mesmo falha no processo de higienização do prepúcio do animal o que aumentou a carga bacteriana em algumas coletas, sendo as amostras um e dois as com maior quantidade de mesófilos.

Os resultados estatísticos obtidos indicam que a adição do extrato em diferentes concentrações não produziu efeitos significativos sobre as variáveis dependentes. O valor de $Pr > F$ extremamente elevado (acima de 0,90 para diversas variáveis) demonstra que não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, sendo as variações observadas atribuíveis ao acaso.

Os dados demonstrados na Tabela 4, estão representados no Figura 1. No caso da presença de *Staphylococcus spp.*, o R-Square é de 0,001955, indicando que menos de 0,2% da variação pode ser atribuída a adição do NP. Além disso, o alto coeficiente de variação sugere uma dispersão significativa nos dados, o que reforça a ausência de uma relação clara entre os tratamentos e os resultados observados.

A presença de mesófilos que teve um valor de $Pr > F$ de 0,0840, sugerindo uma tendência de significância marginal. Esse achado indica que, com ajustes no tamanho amostral ou nas condições experimentais, o efeito do tratamento sobre as bactérias mesófilas poderia emergir como estatisticamente significativo. Esse fator poderia se tornar relevante, sugerindo que o uso de extrato nas concentrações de 0,75% e 1% pode diminuir a quantidade de UFC de mesófilos. Isso pode sugerir problemas na seleção de variáveis ou que os tratamentos aplicados não possuem um efeito forte sobre os parâmetros avaliados.

Em trabalho, Moura *et al.* (2015) aponta que para *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* e outras bactérias não houve atividade bactericida nas concentrações de 5 e 10%, elencando que neste trabalho o acréscimo máximo do NP se deu a 1%,

podendo nessa concentração ocorrer a ineficácia do tratamento para *Staphylococcus spp* de modo geral.

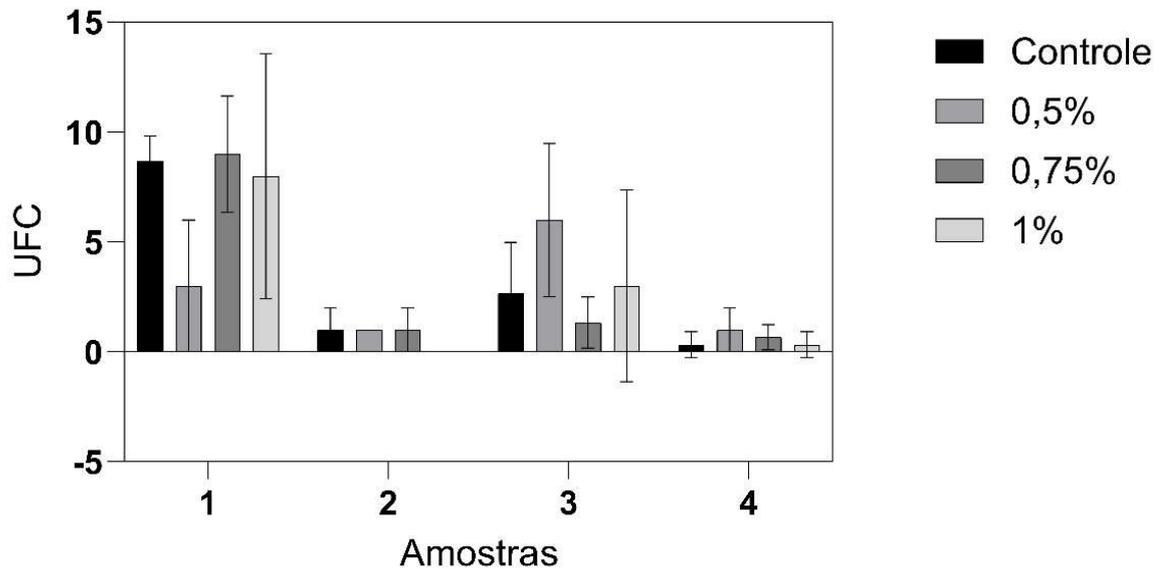


Figura 1 - Descrição gráfica da média e desvio padrão da contagem das UFC das placas de Petri de SM para contagem e quantificação de *Staphylococcus spp*

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Amostra A1 apresentou crescimento tanto de *Staphylococcus spp* quanto de mesófilos, próximos em todos os grupos. A A2 teve uma baixa contaminação por *Staphylococcus spp*, mas uma alta quantidade de mesófilos, A A3 teve valor intermediário para o crescimento de *Staphylococcus spp* e mesófilos. A A4 teve valores médios na contagem de *Staphylococcus spp* e baixa quantidade de mesófilos sendo a amostra com menor contaminação por esse tipo de microrganismo.

Tabela 5 - Descrição da média e desvio padrão da contagem das UFC das placas de Petri de PCA para contagem e quantificação de mesófilos

Bactéria média	Grupo - CT	Grupo - 0,5%	Grupo - 0,75%	Grupo - 1%
Amostra 1	58±21,96	76±8,54	47±26,15	60±72
Amostra 2	113±29,02	60±3	58±8,02	41±5,03
Amostra 3	49±2,08	20,5±9,19	28±1	33±7
Amostra 4	26±3,21	26±4,72	27±8,38	27±9,29

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Os dados da Tabela 5 estão expostos na Figura 2, a fim de melhorar o entendimento.

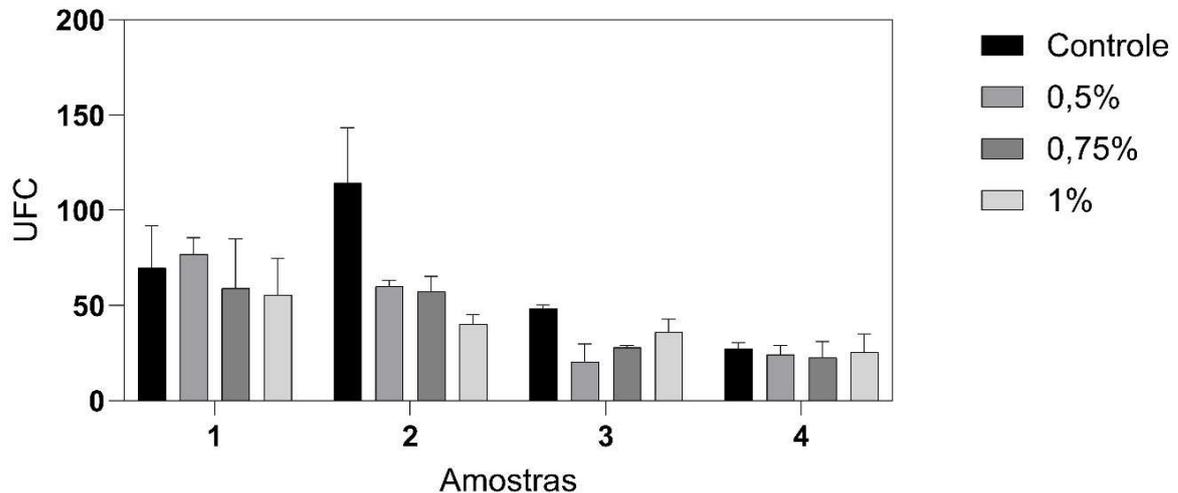


Figura 2 - Descrição gráfica da média e desvio padrão das UFC das placas de Petri de PCA para contagem e quantificação de mesófilos

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Os resultados demonstram que não houve diferença entre o grupo controle e os demais grupos acrescidos com o extrato natural nos valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) no teste de Tukey. Sendo assim, não se pode dizer que o acréscimo do NP apresenta qualquer influência na quantificação de UFC pelo método de contagem de bactérias viáveis por superfície de placa.

A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) preconiza que a contagem bacteriana no sêmen industrializado em centrais não deve ultrapassar 5×10^3 bactérias por ml de sêmen. Sendo que mesmo nas condições mais desejadas, com higiene adequada, a contaminação microbiana geralmente varia entre 150.000 e 650.000 microrganismos/ml (Carvalho, 2012).

Ainda há poucas informações sobre como a presença de microrganismos no sêmen pode impactar diretamente sua capacidade fecundante e causar infecções em fêmeas bovinas. A OIE alterou os padrões de biossegurança e atualmente, não define mais um limite de microrganismos por mL de sêmen para inseminação artificial. No entanto, a contaminação bacteriana tem se mostrado um fator limitante nas técnicas de FIV, especialmente durante o cultivo, onde pequenas quantidades de bactérias

oportunistas podem se multiplicar consideravelmente acarretando o insucesso da técnica (Carvalho, 2012).

Estudos e ensaios clínicos envolvendo uso de extrato e mais especificamente seu acréscimo como diluidor no sêmen são extremamente escassos, podendo apontar seu uso principalmente quando com objetivo de mitigar o estresse oxidativo e preservação da membrana celular dos espermatozoides. Mais estudos devem ser realizados, ainda mais quando levado em conta as capacidades antimicrobianas do NP.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de NP para finalidade de diminuição da carga bacteriana em amostras de sêmen diluído com TRIS-gema acrescidas com NP em diferentes concentrações não apresentou significância para redução no número de UFC nas concentrações apresentadas, sendo pouco eficiente para redução de UFC de *Staphylococcus spp.* Mas outros trabalhos sobre o uso de NP para a redução na quantidade de bactérias são necessários, podendo-se realizar estudos com contaminação experimental, bem como a viabilidade do extrato em meio rico em espermatozoides e no meio diluidor.

5 REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Investigação e controle de bactérias multirresistentes. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.

BARCELOS, R. D. O.; SAVI, P. C. F. Uso de sêmen resfriado e congelado em programas de inseminação artificial em tempo fixo em bovinos. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 10, p. 4217–4229, 14 nov. 2022. Disponível em: <https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/7414>.

BARUSELLI, P. S. et al. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v. 12, n. s1, p. s45–s52, 2018.

BARUSELLI, P. S. et al. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 558–571, 2017.

BERTOL, M. A. F. et al. Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozoides do epidídimo de touros. **Ciencia rural**, v. 44, n. 9, p. 1658–1663, 2014.

BOUMA, A. Transmissible virus diseases in porcine reproduction. **Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]**, v. 35, n. 6, p. 243–246, 2000.

BOZZI, A. D. R. et al. Adição de sucos de laranja, abacaxi e beterraba em diluidor para criopreservação de sêmen de carneiros. *Ciência Animal Brasileira*, v. 24, 2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cab/a/9gLjnNC3WxfQ7rvhNxTHvMP/abstract/?lang=pt>.

BRASIL. **Instrução Normativa n. 47**, de 23 de novembro de 2007. Requisitos sanitários para a importação de sêmen bovino e bubalino oriundo de países extra-mercosul. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 24 out. 2007. Seção 1. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/defesa-agropecuaria/suasa/regulamentos-tecnicos-de-identidade-e-qualidade-de-produtos-de-origem-animal-1/rtiq-leite-e-seus-derivados>.

CARDOSO, A.L.S.P. et al. Pesquisa de Salmonella spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. *Higiene Alimentar*, v.19, n.128, p.144-150, 2005.

CARVALHO, A. F. et al. Validação de nova proposta de espermocultura quantitativa aplicada a sêmen industrializado de touros. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 83–90, 2012.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 40–45, 2017.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 45 p.

COLVILLE, T.; BASSERT, J. M. **Anatomia e fisiologia clínica para medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Elsevier, 2010. 543 p.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). **Panorama do Agro**. Disponível em: <https://cnabrasil.org.br/cna/panorama-do-agro>. Acesso em: 13 de dez de 2024.

ĐURAČKA, M. et al. Bacterial communities in bovine ejaculates and their impact on the semen quality. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 67, n. 6, p. 438–449, 2021.

FREITAS, A. B. DE et al. Action of cryoprotectors glucose, trealose and quitosan in maintaining viability of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* cells after lyophilization. **Ciência animal brasileira**, v. 21, p. e-47464, 2020.

GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.; CARVALHO, A.F. Agentes microbianos associados ao trato genital de touros. *Biológico*, São Paulo, v.73, n.1, p.1-3, 2011. Disponível em: <http://studylibpt.com/doc/5653160/divulga%C3%A7%C3%A3ot%C3%A9cnica-agentes-microbianos>.

GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.P.; FACIOLLI, M.R. et al. Avaliação bacteriológica de sêmen *in natura* industrializado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 403-405, 1999.

GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.P.; FACIOLLI, M.R. et al. Avaliação bacteriológica de sêmen *in natura* industrializado de touros. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, p.403-405, 1999.

GONZÁLEZ, D. et al. Low-density lipoproteins, resveratrol and quercetin as alternative additives to improve boar semen cooling. **Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]**, v. 58, n. 10, p. 1420–1427, 2023.

IBGE. **Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas)**. Rio de Janeiro: IBGE, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>.

- LEITE, A. P. et al. Criopreservação do Sêmen Bovino. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 13, n. 4, p. 279-286, 2011. Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/view/1147>.
- LEMAIRE, M.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Le contrôle de l'infection pas le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Ann. Méd. Vét.*, v.138, n.3, p.167-180, 1994.
- MADEIRA, E.; GOULARTE, Karina; PRADIEE, J.; MONDADORI, R.; BIANCHI, I.; VIEIRA, A.; LEITE, F. The use of antibiotics in cryopreservation of ram sperm. *International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports*, v. 2014, p. 1-7, 2014. DOI: 10.5171/2014.154947.
- MENEGHETTI, M.; VASCONCELOS, J. L. M. Mês de parição, condição corporal e resposta ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte primíparas. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 786–793, 2008.
- MERCADANTE, V. R. G.; LAMB, G. C. Implementing fixed-time artificial insemination programs in beef herds. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 40, n. 1, p. 141–156, 2023.
- MEYER, M. et al. Studies on the pathogen effect of metabolic products of *Staphylococcus aureus* strains on bull semen. **Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 93, n. 4, p. 66–74, 1980.
- MIES FILHO A. Reprodução dos animais/inseminação artificial. 6. ed Porto Alegre, Sulina, 1987. 750p.
- MOURA, A. C. de; BENVEGNÚ, D. M.; BRITO, G. C. de; SOARES, I. A. Atividade antibacteriana de extrato aquoso da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Faz Ciência**, Paraná, v. 21, n. 34, p. 88-101, jul./dez. 2019.
- MOUSSA, M. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1695–1706, 2002.
- PRADO, Ana Cristina Pinheiro et al. Antioxidant properties of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] shell infusion. **Grasas y aceites**, v. 60, n. 4, p. 330-335, 2009.
- PRADO, Enrique A. Silveira; PÉREZ, Roberto Machado. Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 6, n. 10, p. 1-8, 2005.
- QUINN, P. J. et al. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005.

REDA, A. A.; ALMAW, G.; ABREHA, S.; TADEG, W.; TADESSE, B. Bacteriospermia and Sperm Quality of Cryopreserved Bull Semen Used in Artificial Insemination of Cows in South Wollo Zone, Ethiopia. **Vet Med Int.** 2020, v. 2020, p. 2098315. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7204317/>.

RIBEIRO, V. H. A. et al. Avaliação da qualidade do sêmen bovino criopreservado com diluidores de origem animal e vegetal: Evaluation of the quality of cryopreserved bovine semen with diluents of animal and vegetal origin. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 10, p. 66182–66190, 2022.

RODGERS, J. C. et al. An economic evaluation of estrous synchronization and timed artificial insemination in suckled beef cows. **Journal of animal science**, v. 90, n. 11, p. 4055–4062, 2012.

RODRIGUES, M. P. **Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bostaurus taurus* e *Bostaurus indicus*) criados em clima tropical**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SALISBURY, G. W.; VANDEMARK, N. L.; LODGE, J. R., editores. **Fisiologia da reprodução e inseminação artificial de bovinos**. 2. ed. São Francisco: W. H. Freeman and Co., 1978.

SILVA, A. W. L.; SELIG, P. M.; LERÍPIO, A. de A.; NETTO, M. A. Sustentabilidade Agropecuária Segundo a Concepção e a Prática de Extensionistas Rurais do Oeste Catarinense. **Sistemas e Gestão**, v. 8, n. 2, p. 146-159, 2013.

SOUZA, S. E. et al. Adição de vitamina E ao meio de criopreservação de sêmen de bovinos pantaneiros. **Investigação**, v. 18, n. 1, p. 2177–4080, 2019. Disponível em: <https://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/article/view/3289>.

WIERZBOWSKI, S.; NOWAKOWSKI, W.; SMORAG, Z.; KATSKA, L. The influence of bacterial toxins on embryo development in vitro. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND AI, 9., Madrid 1980. p.573-576.